

文章编号 1006-8147(2016)01-0001-04

论 著

## AMPK 腺病毒载体在小鼠骨骼肌中的表达和作用

刘 倩,胡 芳,牛文彦

(天津医科大学免疫学系,天津 300070)

**摘要** 目的:探讨注射 AMPK 腺病毒在小鼠骨骼肌中的表达和作用。方法:C57BL/6 小鼠随机分为 4 组:(1)无任何处理的空白对照组。(2)肌肉注射腺病毒空载体(Ad-GFP)组。(3)肌肉注射 Ad-GFP,48 h 后腹腔注射 AMPK 激活剂 AICAR 组。(4)肌肉注射 GFP 标记的激活型 AMPK 腺病毒(Ad-AMPK-CA)组。注射腺病毒 72 h 后,处死小鼠,通过小动物成像系统测定骨骼肌中的荧光强度,检测腺病毒的表达,用 Western blot 方法检测 ACC 的磷酸化。结果:与空白对照组比较,注射腺病毒组的平均荧光强度显著增高。与病毒空载体组比较,注射 AICAR 组和 Ad-AMPK-CA 组的 ACC 磷酸化水平显著升高。结论:AMPK 腺病毒能在小鼠骨骼肌中表达目的蛋白,调节 AMPK 的作用。

**关键词** AMPK;腺病毒;小鼠;骨骼肌

中图分类号 R392.1

文献标志码 A

### Effect and expression of AMPK adenovirus on mouse skeletal muscle

LIU Qian, HU Fang, NIU Wen-yan

(Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To explore the effect and expression of injected AMPK adenovirus on mouse skeletal muscle. **Methods:** Ten weeks old C57BL/6 male mice were randomly divided into four groups. Mice in group 1 were normal control group without treatment. Mice in group 2 were intramuscularly injected green fluorescence protein adenovirus (Ad-GFP). Mice in group 3 were intramuscularly injected Ad-GFP, after which were intraperitoneally injected AMPK activator AICAR in 48 h. Mice in group 4 were intramuscularly injected Ad-AMPK-CA. Seventy two hours after adenovirus treatment, all mice were executed and the expression of adenovirus was analysed in skeletal muscle. Fluorescence intensity and ACC phosphorylation in skeletal muscle were analysed by vivo imaging system and western blot, respectively. **Results:** Compared with the control group, the mean fluorescence intensity of the experimental groups which were injected adenovirus was significantly higher. Compared with the Ad-GFP group, ACC phosphorylation of AICAR and Ad-AMPK-CA groups were significantly increased. **Conclusion:** AMPK adenovirus can express the target protein in mouse skeletal muscle, and regulate the activity of AMPK.

**Key words** AMPK;adenovirus;mouse;skeletal muscle

2 型糖尿病以葡萄糖代谢异常为特征,主要发病机制是胰岛素抵抗<sup>[1-2]</sup>,肥胖是其主要诱因。通过非胰岛素依赖机制促进外周组织对葡萄糖的摄取和脂肪酸的氧化是 2 型糖尿病治疗的关键。单磷酸腺苷(AMP)激活的蛋白激酶(AMPK)是能量代谢和响应外部刺激的一个关键的调节器<sup>[3]</sup>。它是由一个催化亚基( $\alpha$ )和两个调节亚基( $\beta$ , $\gamma$ )组成的异三聚体酶<sup>[4]</sup>。在营养缺乏和病毒感染时,升高胞内 AMP/ATP 比值和活化一些上游激酶来激活 AMPK,导致  $\alpha$  亚基中的苏氨酸 172 的磷酸化增加,激活 AMPK<sup>[5]</sup>。当 AMPK 被激活时,通过调节下游的信号通路,例

如,AMPK 直接磷酸化乙酰-CoA 羧化酶(ACC)和 HMG-CoA 还原酶(HMGCR),能抑制合成代谢,并促进分解代谢,增加骨骼肌对葡萄糖的摄取,增强脂肪酸的氧化作用和胰岛素的敏感性,因此 AMPK 及其信号通路已成为 2 型糖尿病的预防和治疗热点。本研究通过在 C57BL/6 小鼠中注射激活型 AMPK 腺病毒,检测腺病毒在小鼠体内的表达和作用,为进一步在体内研究 AMPK 信号通路奠定基础。

### 1 材料与方法

**1.1 实验材料** C57BL/6 小鼠购自军事医学科学院实验动物中心,普通饲料购自美国 Research Diets 公司,HEK293 $\beta$ 5 细胞和 AMPK 激活型腺病毒重组质粒(Ad-AMPK-CA)由厦门大学林圣彩教授实验室赠与,DMEM 高糖购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自以色列 Bioind 公司,抗磷酸化 ACC 和 GPADH 抗体购于 Cell Signaling Technology,试剂 AICAR 购

基金项目 国家自然科学基金面上项目基金资助(81170740);高等学校博士学科点专项基金(20121202110014);天津市委应用基础研究重点项目(15JCZDJC35500)

作者简介 刘倩(1989-),女,硕士在读,研究方向:免疫学;通信作者:牛文彦,E-mail:wniu@tjmu.edu.cn。

自 Enzo 公司, 增强化学发光底物检测试剂盒购自美国 Millipore 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** HEK293 $\beta$ 5 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。

**1.2.2 AMPK 腺病毒的包装和扩增** 转染前 24 h, HEK293 细胞接种在 60 mm 培养皿中, 接种密度为 50%~70%。5  $\mu\text{g}$  鉴定好的重组病毒质粒通过 *Pac* I 单酶切处理。将单酶切线性化的重组腺病毒质粒用乙醇沉淀, 离心弃上清。待乙醇挥发完全后, 用 10  $\mu\text{L}$  无菌水重悬质粒。处理过的质粒用 Lipofectamine2000 转染到 HEK293 细胞中。转染完 8 h 后换液, 换液用 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。转染后 7~10 d, 收集细胞, 离心弃上清, 加入 2 mL 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 重悬细胞。通过液氮/37  $^{\circ}\text{C}$  反复冻融 3 次, 让病毒释放, 离心提取含腺病毒的上清。分装保存于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。在 60 mm 培养皿中接种 HEK293 细胞, 细胞密度达 70%, 加入 10  $\mu\text{L}$  上述收集的腺病毒上清液, 感染 72 h 后, 可出现细胞变圆、破裂、漂浮的病变现象。当 50% 以上的细胞出现漂浮时, 可冲匀收集细胞, 液氮反复冻融 3 次。离心提取上清液, 完成病毒扩增。用第一轮裂解的病毒上清液感染 HEK293 细胞即可得到第 2 轮的病毒。

**1.2.3 小鼠分组和处理** SPF 级 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 23 只, 用脂肪含量 10% 的普通饲料喂养小鼠, 小鼠自由饮食饮水, 饲养在温度 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 (55 $\pm$ 10)%、12 h 照明/非照明循环房间。喂养至 10 周, 体质量达 (23.50 $\pm$ 0.78) g, 随机分为 4 组: (1) 无任何处理的空白对照组 (3 只)。(2) 肌肉注射腺病毒空载体 (Ad-GFP) 对照组 (5 只)。(3) 肌肉注射 Ad-GFP, 48 h 后腹腔注射 AMPK 激活剂 AICAR 组 (5 只)。(4) 肌肉注射 GFP 标记的激活型 AMPK 腺病毒 (Ad-AMPK-CA) 组 (5 只)。腺病毒注射量为 110  $\mu\text{L}$ /只, AICAR 为 150 mg/只。腺病毒注射 72 h 后处死小鼠, 取骨骼肌肉。

**1.2.4 体内分布检测** 用小动物成像系统对肌肉组织进行荧光定量分析, 从而确定腺病毒在小鼠骨骼肌的表达。

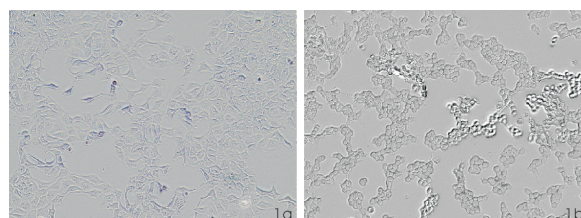
**1.2.5 免疫印记检测 ACC 的磷酸化** 裂解肌肉组织, 将肌肉组织切成小块移至冷的 Eppendorf 管中, 用预冷的 PBS 缓冲液清洗肌肉组织 2 次。0.1 g 肌肉组织中加入 500  $\mu\text{L}$  含蛋白酶抑制剂 (1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1  $\mu\text{mol/L}$  PIC, 200  $\mu\text{mol/L}$  PMSF, 0.5 mmol/L NaF) 的组织裂解液, 用超声匀浆破碎机裂解组织样

品。预冷离心机至 4  $^{\circ}\text{C}$ , 13 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 重复两次。按照 BCA Protein Assay Kit 说明书来测定蛋白浓度, 再与 5 $\times$ LSB 缓冲液按 4:1 的比例混合, 65  $^{\circ}\text{C}$  加热 15 min, 7.5% (V/V) SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品, 转到 PVDF 膜上, 用 3% 牛血清蛋白封闭 2 h, 再分别用各自一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 二抗使用偶联辣根过氧化物酶 HRP 的山羊抗兔 IgG 和山羊抗鼠 IgM 孵育 2 h, 蛋白条带用增强化学发光法检测, 曝光胶片。用 GAPDH 作为内参, Image J 软件定量, 即可检测蛋白的磷酸化水平。

**1.3 统计学处理** 采用 GraphPad Prism6 统计软件进行统计学分析, 计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞形态学改变** 显微镜下观察正常 HEK293 细胞为多角形, 触角相连呈网状贴壁生长。腺病毒感染 HEK293 细胞后, 细胞变圆, 触角消失, 部分细胞破碎漂浮, 未脱落细胞有聚集融合 (图 1)。



a: 正常 HEK293 $\beta$ 5 细胞 ( $\times 40$ ); b: 被腺病毒感染的 HEK293 $\beta$ 5 细胞 ( $\times 40$ )

图 1 腺病毒载体感染细胞后形态改变

Fig 1 Morphological changes in HEK293 cells infected with adenovirus

**2.2 GFP 荧光标记的腺病毒在骨骼肌中的检测结果** 腺病毒质粒中带有绿色荧光蛋白 GFP, 可以对腺病毒的感染表达进行追踪观察。收取小鼠骨骼肌肉组织, 通过小动物活体成像系统, 检测肌肉中 GFP 标记的腺病毒的荧光强度, 确定腺病毒感染到小鼠组织中。如图 2 所示, 以未注射病毒的小鼠组织为背景对照组, 注射腺病毒实验组的小鼠骨骼肌中能检测出荧光强度, 通过荧光定量分析与背景对照组比较有显著差异 (图 3), 说明腺病毒已转染到小鼠肌肉组织中。

**2.3 Western blot 检测磷酸化 ACC 水平** 检测了 AMPK 的下游 ACC 的磷酸化水平以判断激活 AMPK 的效果, 确保在小鼠体内发挥作用。如图 4 所示, AICAR 是 AMPK 的激活剂, 与病毒空载体对照组比较, 注射 AICAR 的实验组磷酸化 ACC 水平升高, 为对照组的 (1.51 $\pm$ 0.15) 倍 ( $P<0.01$ ), 注射 Ad-AMPK-CA 组的磷酸化 ACC 水平上升至对照组的

( $1.91 \pm 0.09$ )倍( $P < 0.001$ )。

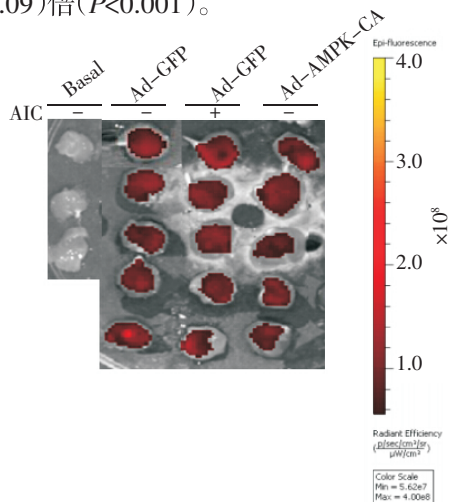
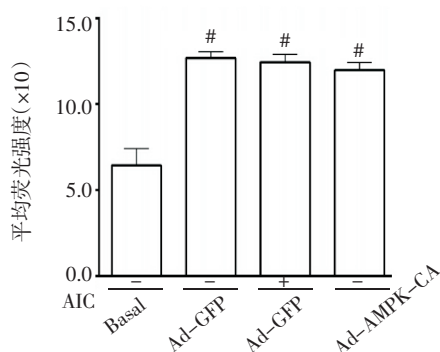


图 2 GFP 在骨骼肌中的表达

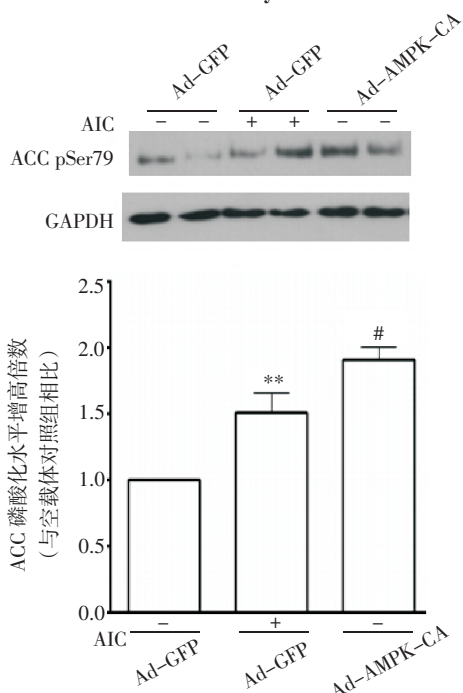
Fig 2 Expression of green fluorescence protein in skeletal muscle



与空白对照组相比, # $P < 0.001$

图 3 骨骼肌中荧光定量分析结果

Fig 3 The mean fluorescence intensity in skeletal muscle



与空载体对照组相比, \*\*  $P < 0.01$ , #  $P < 0.001$

图 4 骨骼肌中磷酸化 ACC 蛋白的表达

Fig 4 The phosphorylation of ACC in mouse skeletal muscle

### 3 讨论

糖尿病已成为一个重大的公共健康问题,预计到 2030 年,其发病率将达到 7.7%,患病人数将增加至 4.39 亿<sup>[6]</sup>。2 型糖尿病是其最常见的形式,其特征是胰岛素抵抗,骨骼肌减少了对胰岛素的敏感性是重要原因<sup>[7-8]</sup>。骨骼肌是利用葡萄糖的主要外周组织,AMPK 的活化能促进骨骼肌摄取葡萄糖。AMPK 是一个丝氨酸 / 苏氨酸磷酸激酶,AMPK 的  $\alpha$  亚型具有催化活性。 $\alpha 1$  亚型广泛表达,而  $\alpha 2$  亚型在肝脏、心脏和骨骼肌中高表达<sup>[9]</sup>。Thr172 是 AMPK  $\alpha$  亚型的主要的磷酸化位点,其磷酸化是 AMPK 催化活性必不可少的。肌肉收缩和运动能激活 AMPK<sup>[10]</sup>。本实验中 Ad-AMPK-CA 突变位点在 T142,而 AMPK 抗体检测的磷酸化位点在 Thr172,因此需要检测 AMPK 下游蛋白的磷酸化水平判断 AMPK 的活性。ACC 是存在于胞液中的变构羧化酶,通过生物素羧化酶功能和羧基转移酶功能催化乙酰辅酶 A 生成丙二酸单酰辅酶 A,是脂肪酸代谢的限速酶,是 AMPK 的下游分子<sup>[11-12]</sup>。激活 AMPK 进而使 ACC 磷酸化增加,活性降低。5-氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸(AICAR)是细胞可渗透腺苷类似物,通过腺苷转运蛋白能被细胞吸收,腺苷激酶快速磷酸化,形成 5-氨基咪唑-4-甲酰胺-1- $\beta$ -D-呋喃核糖苷(ZMP),通过模拟放大作用增加 AMPK 的活性<sup>[13]</sup>,在体内和体外实验中作为一种激活 AMPK 的工具。本实验中,Ad-AMPK-CA 和 AICAR 都显著升高小鼠骨骼肌 ACC 的磷酸化水平,说明二者在小鼠体内发挥着增加 AMPK 活性的作用。

在基因工程中所运用的病毒载体是一种定向或非定向的载体,来源于病毒的 DNA 或者 RNA 基因组。RNA 病毒的逆转录病毒载体中,应用广泛的是慢病毒。慢病毒载体是指以 HIV-1 来源的一种病毒载体<sup>[14]</sup>,能够感染多种难感染的细胞,比如原代细胞、干细胞、神经元细胞等。慢病毒能够将外源基因插入细胞基因组内,实现稳定转染,但是重组病毒的滴度不够高,而且有导致基因突变的危险。DNA 的病毒载体中,应用广泛的是腺病毒和腺相关病毒。腺病毒相对稳定,可以长时间冷冻储存而不失去感染能力,可以有效地转染各种细胞类型和组织<sup>[15]</sup>,易于基因重组操作,繁殖滴度高,安全性好,发生插入突变率低。穿梭质粒中含有编码 GFP 的序列,方便追踪检测<sup>[16]</sup>。本实验中 AMPK 腺病毒和腺病毒空载体均含有 GFP 荧光蛋白,小动物活体成像采用荧光报告基因 GFP 进行标记,通过激发光激发荧光基团到达高能状态,而后产生发射光,通过后期



的特有的软件处理,有效地除去动物自身所发出的荧光信号,对肌肉组织进行定性和定量分析。通过小动物成像和荧光强度定量分析结果表明,AMPK 腺病毒成功转染至小鼠骨骼肌中。

综上所述,肌肉多部位注射 AMPK 腺病毒能感染至小鼠骨骼肌中,并且能够表达目的蛋白,调节 AMPK 的活性。AMPK 腺病毒可作为一种实验方法,用于 AMPK 的体内研究。

#### 参考文献:

- [1] Klip A, Ramlal T, Young D A, et al. Insulin-induced translocation of glucose transporters in rat hindlimb muscles[J]. FEBS Lett, 1987, 224(1):224
- [2] Lund S, Holman G D, Schmitz O, et al. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(13):5817
- [3] Krabbe K S, Nielsen A R, Krogh-Madsen R, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes[J]. Diabetologia, 2007, 50(2):431
- [4] Xie W, Wang L, Dai Q, et al. Activation of AMPK restricts coxsackievirus B3 replication by inhibiting lipid accumulation[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 85(8):155
- [5] Mihaylova M M, Shaw R J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(9):1016
- [6] Shi L, Zhang T, Liang X, et al. Dihydropyridine improves skeletal muscle insulin resistance by inducing autophagy via the AMPK signaling pathway[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 409(6):92
- [7] Tunduguru R, Chiu T T, Ramalingam L, et al. Signaling of the p21-activated kinase (PAK1) coordinates insulin-stimulated actin remodeling and glucose uptake in skeletal muscle cells[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 92(2):380
- [8] Xiao B, Sanders M J, Underwood E, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP[J]. Nature, 2011, 472(7342):230
- [9] Niesler C U, Myburgh K H, Moore F. The changing AMPK expression profile in differentiating mouse skeletal muscle myoblast cells helps confer increasing resistance to apoptosis[J]. Exp Physiol, 2007, 92(1):207
- [10] O'Neill H M, Maarbjerg S J, Crane J D, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(38):16092
- [11] Choi J W, Da Silva N A. Improving polyketide and fatty acid synthesis by engineering of the yeast acetyl-CoA carboxylase[J]. J Biotechnol, 2014, 187:56
- [12] Zordoky B N, Nagendran J, Pulinkunnil T, et al. AMPK-dependent inhibitory phosphorylation of ACC is not essential for maintaining myocardial fatty acid oxidation[J]. Circ Res, 2014, 115(5):518
- [13] Gadalla A E, Pearson T, Currie A J, et al. AICA riboside both activates AMP-activated protein kinase and competes with adenosine for the nucleoside transporter in the CA1 region of the rat hippocampus[J]. J Neurochem, 2004, 88(5):1272
- [14] Katzourakis A, Tristem M, Pybus O G, et al. Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(15):6261
- [15] Khare R, Chen C Y, Weaver E A, et al. Advances and future challenges in adenoviral vector pharmacology and targeting[J]. Curr Gene Ther, 2011, 11(4):241
- [16] Li X, Liu Q, Bi X, et al. An in vitro model to evaluate virus aerosol characteristics using a GFP-expressing adenovirus[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(Pt 11):1335

(2015-08-16 收稿)

## 关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母,也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母  $\bar{x}$ , 卡方的符号是希腊字母  $\chi^2$ , 自由度的符号是希腊文“ $\nu$ ”, 不是拉丁文“V”。样本的相关系数是英文“ $r$ ”, 不能误为希腊文“ $\gamma$ ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号, 都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“-”或“+”表示。例如  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{P}^{3-}$  等等, 不采用  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{P}^{--}$ 、 $\text{Al}^{+3}$ 、 $\text{O}^{-2}$  表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角, 例如  $^{131}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 。表示激发状态的  $m$  写在右上角, 例如:  $^{99}\text{Tc}^m$ 、 $^{133}\text{In}^m$ 。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称, 即不能写成  $^{131}$  碘、 $^{133}$  铟 $^m$  等。

近几年分子生物学发展很快, 并已渗透到许多学科, 大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式, 要对符号的来源及其内涵有深刻的了解, 使用时不致发生错误, 例如: RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写, RNA 应大写。

(编辑部)